

pH 值对沼液培养的普通小球藻生长及油含量积累的影响

王翠, 李环, 王钦琪, 韦萍

南京工业大学 生物与制药工程学院, 南京 210009

摘要: 以 50% 的沼液为普通小球藻的全营养培养基, 考察培养基的起始 pH 值对小球藻生长及油脂含量的影响, 普通小球藻对不同初始 pH 的沼液中氮、磷的去除情况。设定了 2 组实验, 一组只调节初始接种培养液的 pH, 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5; 另一组将培养液 pH 分别固定在 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, pH 用稀 HCl 和 NaOH 进行调节。研究发现在 pH 6.5 和 pH 7.0 的偏酸环境有利于小球藻生长, 而 pH 在 7.0~8.5 的偏碱性条件下有利于小球藻油脂的积累, 因此综合小球藻生长和油脂积累 2 个因素, 得到最适合小球藻生长和油脂积累的 pH 为 7.0。培养结束后沼液中氮磷的去除率分别达到了 95% 和 97%, 沼液中的总氮由原来的 134.91 mg/L 降至 4.86 mg/L, 总磷由 10.19 mg/L 降到 0.32 mg/L。

关键词: 普通小球藻, pH, 沼液, 油脂

Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry

Cui Wang, Huan Li, Qinqi Wang, and Ping Wei

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: Using 50% biogas slurry as basic medium, we investigated the effect of pH on the growth and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris*. Setting two-group experiments, one was only control the initial medium pH, the initial pH was set at 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, and 8.5, respectively. One was control the medium pH constant, set constant pH at 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, and 8.5, respectively. Using HCl and NaOH regulated the pH. Results showed that algae *Chlorella vulgaris* grows better at pH 6.5 and 7.0, accumulate the lipid at pH 7.0–8.5, so the optimal pH for the growth and the lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* was 7.0. The average removal rate of nitrate from biogas slurry was 95%, phosphate was 97%.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, pH, biogas slurry, lipid

随着经济的不断发展, 人类对能源的需求量越来越大, 而地球上化石能源储量有限, 且对环境污染严重, 以储量丰富且环境友好的生物质能源代替化石能源已成为解决能源危机的主要途径之一^[1]。

Received: December 2, 2009; **Accepted:** April 13, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724702), Nanjing University of Technology Discipline Funds (No. 39708010).

Corresponding author: Cui Wang. E-mail: kaolacui@yahoo.com.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724702), 南京工业大学学科基金 (No. 39708010) 资助。

在各种形式的生物质能源中,富油品系的自养型微藻由于可吸收大气中 CO_2 、油脂含量较高且营养需求简单而备受关注^[2-4]。但目前看来,微藻生物质能存在藻源受限的问题,即微藻大规模培养技术尚处在摸索阶段,如适应于各种藻类的光生物反应器需研制开发或改进,大规模培养微藻时存在易染杂菌杂藻、微藻光合作用效率低、培养基成本高等问题,制约了微藻生物质能源产业的发展。发展微藻生物质能源产业,当务之急是开发优良品系富油微藻及降低微藻培养成本。

利用废弃生物质厌氧发酵产沼气是另一种清洁型生物质能源的形式,发酵副产物沼液和沼渣通常直接排放入水体或填埋。由于沼液中含有丰富的氮、磷等物质,大量的沼液直接排放会引起河流的富营养化,造成水体的污染,已被环保部门勒令停止,故沼液的后处理问题已成为当前沼气生产厂家急需解决的问题,甚至部分厂家为此而停产。

为解决沼气发酵的废液排放及微藻的培养基成本问题,本文以富油小球藻为实验藻株,以国家生化工程中心沼气发酵的废液为培养基筛选并驯化适应于该沼液的富油小球藻,创见性地将沼气发酵和微藻培养有机结合起来,结果经过几个星期的驯化并筛选后,该小球藻可适应沼液的培养环境正常生长并积累油脂,小球藻吸收利用后的沼液氮磷指标也达到了直接排放的标准。本研究主要报道了沼液 pH 值对小球藻生长产油及沼液氮磷去除率的综合影响,为小球藻的规模化培养及应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验藻种

本实验培养用的小球藻为普通小球藻 *Chlorella vulgaris*,由暨南大学张成武教授提供。

1.1.2 沼液培养基

沼液来自南京工业大学国家生化工程中心沼气罐沼气发酵后的废液,初始 pH 值在 9.0~9.5 之间。沼液经过静置、沉淀后,纱布抽滤去除颗粒悬浮物,以自来水稀释到 25%、50%、75%、100% 浓度,并以 HCl 或 NaOH 调制 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、

7.5、8.0、8.5 的沼液培养基,高压蒸汽灭菌后备用。

1.1.3 培养装置

实验中所采用的培养装置为自行设计的柱状光合生物反应器,内管径为 3 cm,管长度为 55 cm,厚度为 0.3 cm,装液量 300 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 微藻的培养

将新鲜活化后的藻种接种到不同 pH 的沼液培养基,使起始 OD_{680} 值为 1.0 左右。光照强度为 4 800 lux,光照:光暗周期为 18 h:6 h,温度 25℃ 左右,通入空气培养,每天定时测定 pH 值变化,并且用稀盐酸或氢氧化钠调节培养液的 pH,每天取样测定 OD_{680} 值。

1.2.2 生物量的测定

浊度法:取小球藻藻液,测定其在 680 nm 下的光密度值 (OD_{680}) 以此衡量小球藻相对生长量。

干重法:收集稳定期的藻液,10 000 r/min 离心后取沉淀,洗涤去除表面吸附杂质后 60℃ 烘至恒重,称重。

1.2.3 培养液中氮磷含量的测定

总氮的测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法,参照 GB11894-89^[5]。总磷的测定采用钼酸铵分光光度法,参照 GB11893-89^[6]。

1.2.4 油脂的提取方法^[7]

称取 0.1 g 干藻粉,加入含有 10% 二甲基亚砷的甲醇溶液在 40℃~70℃ 水浴提取 30 min,然后吸去上清,下层的藻泥中加入乙醚和正己烷 (1:1, V/V) 提取 1 h。按照上述步骤反复提取直至藻粉完全变白,合并各步上清,使得上清液中甲醇:乙醚:正己烷:水的体积比为 1:1:1:1,放入分液漏斗中静置分层,吸取上层,氮气吹干,剩余为油脂。

2 结果与讨论

2.1 沼液浓度的选取

高浓度沼液所含营养物质较多,但沼液本身具有一定的浊度,浊度太高不利于光的透过,对小球藻的光合作用率有负面影响,而浓度太低所含的营养物质也有限,不利于微藻的生长,适合于微藻生长的沼液浓度培养基由这两方面因素综合决定。

将不同浓度沼液培养基的初始 pH 调至 7.0, 接种驯化培养基中保存的藻种, 初始生物量 OD_{680} 皆为 1.2, 装液量皆为 300 mL, 以日光灯为光源 16:8 光暗培养, 每天取样测定 680 nm 下的吸光值, 考察小球藻在不同浓度的沼液培养基中的生长情况, 结果见图 1。

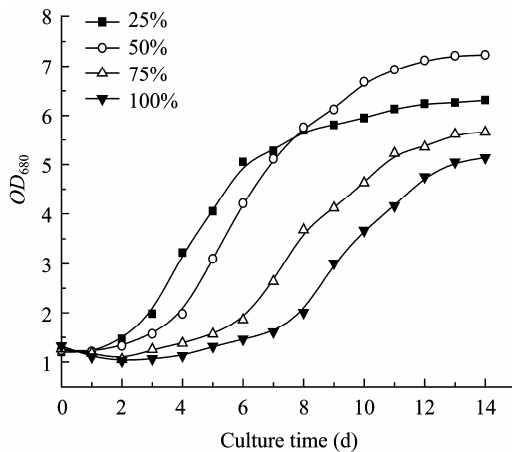


图 1 沼液浓度对小球藻生长的影响

Fig. 1 Effect of different concentration biogas slurry on the growth of *Chlorella vulgaris*.

可以看出, 小球藻在不同浓度沼液中表现出的生长规律不尽相同。在 25% 沼液浓度培养基中小球藻快速进入对数生长期, 在 50% 以上的沼液培养基中需较长的延滞期才可以适应生长。小球藻在不同浓度沼液中表现出的生长差异与沼液本身的浊度及其所含的营养物质有关。25% 浓度沼液的浊度较低, 光的透过率好, 故最先进入对数生长期, 但是 25% 沼液浓度中营养成分含量较少, 所以小球藻很快进入稳定期。75% 和 100% 浓度的沼液浊度较高, 光的透过率较低, 小球藻的光合作用较弱, 对小球藻的生长不利。综合考虑生物量、生长速率及生长周期, 选定 50% 浓度沼液为小球藻生长的全营养培养基。

2.2 不同 pH 值条件对小球藻生长的影响

培养基的 pH 值会影响光合作用中 CO_2 的可用性, 在呼吸作用中影响微藻对有机碳源的利用效率, 同时由于 pH 值直接影响细胞膜的渗透性, 会影响微藻细胞对培养液中离子的吸收和利用, 以及代谢产物的再利用性和毒性, 故 pH 值是影响藻类生长代谢的重要因子之一^[8-11]。小球藻喜欢弱碱性

(pH 7.2~8.2), 但是弱酸性 (pH 5.8~6.8) 的水中也能生活和繁殖^[9]。以 pH 计测得 50% 沼液培养基的 pH 在 9.0 左右。用 10% 的盐酸将培养基的 pH 分别调为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 在培养过程中设置两组实验, 一组 pH 只调一次为初始 pH 组, 另一组在培养过程中通过用稀盐酸或稀碱调节 pH, 使 pH 值相对稳定在 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 称为固定 pH 组。考察 50% 浓度沼液培养基的 pH 值对小球藻生长的影响 (图 2)。

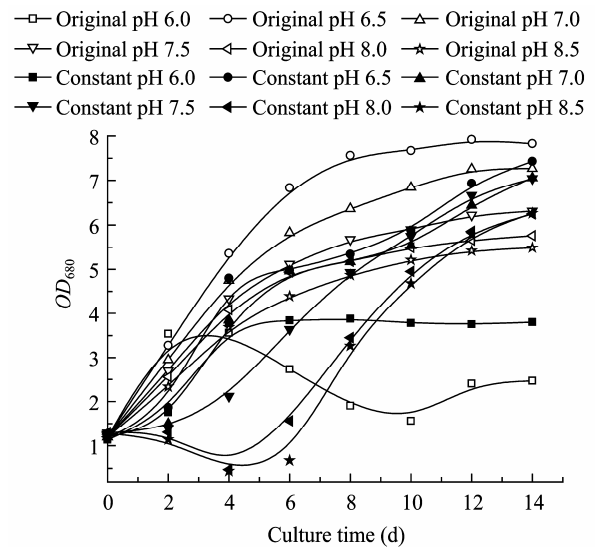


图 2 不同 pH 条件对小球藻生长的影响

Fig. 2 Effect of different pH values on growth of *Chlorella vulgaris*.

图 2 中空心图标为不同初始 pH 组小球藻的生长曲线。培养过程中测定生物量的同时测定了培养基 pH 值的变化, 发现初始 pH 为 6.0 的培养液在第 4 天 pH 降到 4.8, 这解释了 pH 6.0 的藻细胞生长较差的原因。经过 6 d 的适应性驯化后少量藻细胞存活下来并开始生长, 到第 10 天时 pH 回升为 5.5, 并最终稳定在 5.5。初始 pH 6.5 培养液的 pH 稳定在 6.0 左右, 其他不同初始 pH 的培养液最终 pH 降到 7.0 左右并保持稳定。

可见在小球藻的生长过程中, 培养液的 pH 变化较大, 只要初始 pH 对藻不产生很大毒害, 使其不能生长, 小球藻会在生长过程中因为自身生理代谢活动会降低生活环境的 pH, 改变后的 pH 有可能已偏离该藻的最佳生长范围, 所以只调初始 pH 不能正确

反映小球藻适宜生长的 pH 范围,有必要固定 pH,使藻在生长过程中一直处于设定的 pH 条件下。观察固定 pH 对藻细胞的影响,结果如图 2 中实心图标所示。

固定 pH 组在 pH 6.0 和 pH 6.5 的弱酸性条件下小球藻最快进入对数生长期, pH 6.0 的藻细胞第 5 天到达稳定期,此后至培养结束一直处于稳定期的状态。这说明在 pH 6.0 的条件下小球藻能够存活,但是此 pH 不利于小球藻的进一步分裂代谢。pH 8.0 和 pH 8.5 的碱性条件下藻细胞没有增殖便大量死亡,少量存活的细胞经过很长的一段期在第 7 天开始增殖进入对数生长期。pH 7.5 的弱碱性环境小球藻经过较短延滞期后在第 4 天开始进入对数生长期。整体说来, pH 6.5~7.0 的微酸性或酸性环境较适宜小球藻的生长代谢。

比较只调初始 pH 组和固定 pH 组,可以发现两种 pH 条件下藻的生长规律并不相同,固定 pH 条件下藻的生长优于只调初始 pH 条件。

2.3 不同 pH 条件对普通小球藻生物量和油脂含量的影响

不同 pH 对小球藻生物量的影响见表 1,结果表明 pH 为 6.0 时小球藻生物量最低,一直调节 pH 使其稳定在 6.0 左右的培养组的生物量要高于初始 pH 为 6.0 的培养组,前者生物量为 1.3116 g/L,后者为 0.8312 g/L。从表 1 中可以看到除 pH 为 6.5 和 7.0 外,其他 pH 条件下,在培养过程中固定 pH 组的生物量均高于只调初始 pH 组。小球藻的生物量在 pH 为 6.5 时最高,达到 2.6935 g/L。

表 1 不同 pH 条件对小球藻生物量和油脂含量的影响比较
Table 1 Comparison with different pH values for the biomass and lipid content of *Chlorella vulgaris*

Different pH values	Biomass (g/L)		Lipid content (%)	
	Different original pH group	Different constant pH group	Different original pH group	Different constant pH group
6.0	0.831	1.312	17.3	41.2
6.5	2.694	2.626	33.2	39.6
7.0	2.518	2.508	37.0	47.7
7.5	2.174	2.307	39.3	47.6
8.0	1.982	2.172	39.9	49.5
8.5	1.901	2.064	38.8	49.6

从表 1 可以看到,培养过程中固定 pH 组的油脂含量均高于只调节初始 pH 组,并且偏碱性的环境有利于油脂的积累。固定 pH 组油脂含量最高的是 pH 8.0 和 pH 8.5 均达到了 49%, pH 为 7.0 和 7.5 培养的小球藻油脂含量均达到了 47%, pH 为 6.0 和 6.5 培养的小球藻油脂含量也在 40% 左右。而只调节初始 pH 组最高油脂含量在 pH 8.0 为 39.9%。这说明固定的 pH 对小球藻油脂含量的积累有益,综合 pH 对小球藻生物量的影响来看,小球藻最适生长和油脂积累的 pH 为 7.0。

2.4 小球藻对沼液培养基中氮磷的去除

小球藻喜欢氮磷化合物比较丰富的水, Fritch 等学者认为绿球藻目 (Chlorococcales) 的许多类群,包括小球藻等属的种类都具有明显的营腐生生活的倾向,因此,小球藻在富含有机质的污水中均能大量生长^[8-9]。沼液中含有丰富的有机质、腐殖酸、氮、磷、钾等营养成分及氨基酸、维生素、酶、微量元素等生命活性物质。其中富营养化元素氮磷含量丰富,如果直接排放会造成水体二次污染^[10-12]。小球藻生长过程中可吸收利用沼液中的营养物质,从而达到降低沼液中氮磷等主要污染指标而达到处理废水的目的。经过测定 50% 沼液培养基中总磷的初始含量为 10.19 mg/L,总氮的初始含量为 134.91 mg/L。

实验沼液培养基中的磷含量较低,培养 2 h 后培养液中磷的利用率达到了 70%~80%,培养到 72 h 时,培养液中磷含量已经降到 0.642 mg/L,小球藻对磷的利用率已经达到了 95%,培养结束后沼液中磷含量降低至 0.32 mg/L,小球藻对磷的利用率达到 97%。

不同初始 pH 条件下小球藻对沼液培养基中氮的吸收利用情况见图 3,培养 1 d 后培养液中氮的利用率达到 56.4%~71.2%,培养结束后除初始 pH 为 6.0 的培养液中氮含量降为 19.12 mg/L 小球藻对氮的利用率为 86% 以外,其他培养液中小球藻对氮的利用率均达到 95% 左右,培养液中的含氮量降为 4.86 mg/L。这说明小球藻可以很好地去除沼液中的氮和磷,使沼液的最终排放达到了污水排放标准水

平^[13]。实验结果表明不同初始 pH 对培养液中磷的吸收影响不大,这与沼液培养基中磷的含量低有一定关系。对氮的影响只有初始 pH 为 6.0 的培养液氮的利用率为 86%,其他都达到 95%左右,这也与不同初始 pH 条件下小球藻的生长情况有关。

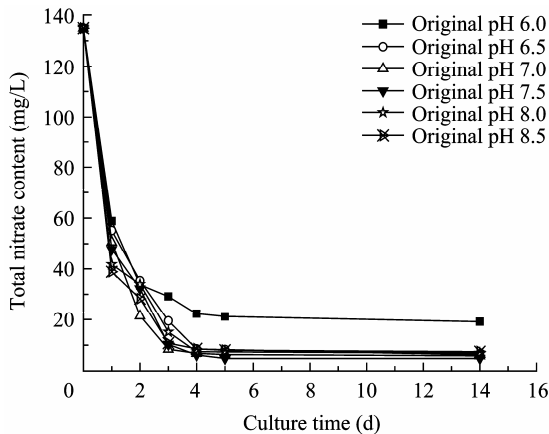


图3 pH对普通小球藻氮源吸收的影响

Fig. 3 Effect of pH on the nitrate absorption of *Chlorella vulgaris*.

3 结论

本实验研究了不同浓度沼液培养小球藻和不同 pH 值条件下利用沼液培养的小球藻生长状况和油脂含量的积累情况,以及在不同 pH 条件下小球藻对沼液中氮磷的去除作用。研究表明,50%浓度的沼液最适合小球藻生长,此外小球藻在生长过程中会引起培养液中的 pH 变化,使培养液的 pH 偏酸。为了进一步了解 pH 对小球藻生物量和油脂的影响,进行了不同固定 pH 培养液培养小球藻实验,结果表明:小球藻最适宜生物量积累的 pH 为 6.5~7.0,油脂含量方面,固定 pH 组小球藻的油脂含量明显高于只调初始培养液 pH 组培养的小球藻,固定 pH 组小球藻油脂均在 40%以上,最高达 49%,pH 7.0 时小球藻油脂含量达 47%。因此得出最适小球藻生长和油脂积累的 pH 为 7.0。

不同初始 pH 条件下培养的小球藻对沼液中氮磷均有很好的去除作用,培养结束后培养液中总磷由 10.19 mg/L 降到 0.32 mg/L,小球藻对磷的利用率达到 97%,培养液中总氮由初始含量 134.91 mg/L 降至 4.86 mg/L,小球藻对氮的利用率达到 95%。经

过小球藻的利用后沼液中的富营养化元素氮和磷含量大大降低,使得沼液的排放达到了污水综合排放标准^[9],防治了环境污染。

因此,利用沼液培养小球藻不但降低了微藻生物柴油的生产成本,还净化了沼液大大去除了沼液中的富营养化元素氮和磷。但是沼液中的营养成分毕竟有限,沼液培养的小球藻生物量较低,若要提高生物量还要对沼液成分进行优化,这些将在接下来的试验中进行研究。

REFERENCES

- [1] Miao XL, Wu QY. Exploitation of biomass renewable energy sources of microalgae. *Renewable Energy*, 2003, **21**(3): 13-17.
缪晓玲, 吴庆余. 微藻生物质可再生能源的开发利用. 可再生能源, 2003, **21**(3): 13-17.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 2007, **25**(3): 294-306.
- [3] Mulbry W, Kondrad S, Buyer J. Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. *J Appl Phycol*, 2008, **20**(6): 1079-1085.
- [4] Doucha J, Straka F, Livansky K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *J Appl Phycol*, 2005, **17**(5): 403-412.
- [5] GB/T11894-89, Measurement of total nitrogen in water by basic potassium persulphate digestion ultraviolet spectrophotometry.
GB/T11894-89 水质总氮的测定碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法.
- [6] GB/T11893-89, Measurement of total phosphorus in water by ammonium molybdate spectrophotometry.
GB/T11893-89 水质总磷的测定钼酸铵分光光度法.
- [7] Bigono C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, et al. Lipid and fatty composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incise*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 2002, **60**(5): 497-503.
- [8] Jiang F, Chen Y. *Microalgae Biotechnology*. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 66-68.
姜峰, 陈悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 66-68.
- [9] Hua RC. *Culture and Utilize Unicellularalgae*. Beijing:

- Agricultural Publishing House, 1986: 23-32.
- 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用. 北京: 农业出版社, 1986: 23-32.
- [10] Li LX, Zhou CJ. Technology of biogas slurry separate multipurpose utilization. *Eco Agri*, 2007, **24**(1): 45-46.
- 黎良新, 周丛钜. 沼液分层综合利用技术. 生态农业, 2007, **24**(1): 45-46.
- [11] Zhang GZ, Yao AL, Gu YX, *et al.* A preliminary study on using algae to eliminate nitrogea and phosphorus from anaerobically digested slurry. *China Biogas*, 1997, **15**(4): 11-15.
- 张国治, 姚爱莉, 顾蕴璇, 等. 藻类对沼液中氮、磷去除作用的初步研究. 中国沼气, 1997, **15**(4): 11-15.
- [12] Guo Q, Chai XL, Cheng HJ, *et al.* Comprehensive utilizing of biogas liquid residue. *Renew Resour Res*, 2005, **75**(6): 37-41.
- 郭强, 柴晓利, 程海静, 等. 沼液的综合利用. 再生资源研究, 2005, **75**(6): 37-41.
- [13] GB/T8978-1996, Standard for discharge of wastewater. GB/T8978-1996 污水综合排放标准.